

**Meilensteine in der Verlaufskontrolle von Patienten mit JAK2
p.V617F positiver myeloproliferativer Neoplasie
nach Stammzelltransplantation**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Anja Edelmann
geb. 18.03.1986, Berlin

angefertigt an: Universität Leipzig
Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie

Betreuer: Privatdozent Dr. med. Thoralf Lange
Professor Dr. med. Dr. hc. Dietger Niederwieser

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom 17.06.2014

Vorbemerkung

Für die Darstellung der Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit wurde die kumulative Form der Promotion gewählt.

Die hierfür benötigte Publikation ist in der Zeitschrift Haematologica im Mai 2013 erschienen und in die Arbeit eingefügt. Sie enthält eine genaue Darstellung der Methodik, aller relevanten experimentellen Daten sowie Tabellen zur Verdeutlichung der Ergebnisse.

Bibliographischer Nachweis der Publikation (geteilte Erstautorschaft*)

Lange T*, Edelmann A*, Siebolts U, Krahel R, Nehring C, Jäkel N, Cross M, Maier J, Niederwieser D, Wickenhauser C. 2013. JAK2 p.V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms one month after allogeneic stem cell transplantation significantly predicts outcome and risk of relapse. Haematologica 98 (5): 722-8

Bibliographische Beschreibung

Edelmann, Anja

Meilensteine in der Verlaufskontrolle von Patienten mit JAK2
p.V617F positiver myeloproliferativer Neoplasie
nach Stammzelltransplantation

Universität Leipzig, Dissertation

30 S., 37 Lit., 6 Abb., 4 Tab.

Referat:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Quantifizierung JAK2 p.V617F mutierter Allele zur Verlaufskontrolle von Patienten mit JAK2 p.V617F positiven MPN nach allogener Stammzelltransplantation (SCT). Dabei sollte insbesondere untersucht werden, ob sich frühzeitig nach SCT ein höheres Rezidivrisiko der MPN vorhersagen lässt und zu welchen Zeitpunkten molekulare Untersuchungen nach SCT sinnvoll sind.

Wir analysierten retrospektiv den Krankheitsverlauf von 30 Patienten. Dafür verwendeten wir die ARMS-QPCR und WTB-AS QPCR als zwei allel-spezifische Amplifikationsmethoden und untersuchten 142 Proben der ersten Kohorte (n=14) und 32 Proben einer zweiten Kohorte (n=16) im direkten Vergleich.

Aus unseren Ergebnissen konnten folgende Rückschlüsse gezogen werden:

1. Die beiden allel-spezifischen Amplifikationsmethoden ARMS-QPCR und WTB-AS QPCR zur Quantifizierung der JAK2 p.V617F Mutation sind vergleichbar.
2. Als Ausgangsmaterial sind antikoaguliertes Vollblut oder auch Beckenkammbiopsien gleichermaßen geeignet.
3. Der Nachweis von $> 1\%$ JAK2 p.V617F Allele 28 Tage nach allogener SCT ist assoziiert mit einem signifikant höheren Rezidivrisiko einer JAK2 positiven MPN und einem schlechteren Gesamtüberleben.

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung.....	II
Bibliographische Beschreibung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
1 Einführung in die Thematik	1
1.1 Myeloproliferative Neoplasien	1
1.1.1 Diagnosekriterien der WHO von 2008.....	1
1.1.2 Die JAK2 p.V617F Mutation bei MPN	2
1.1.3 Prognoseabschätzung	5
1.2 Therapeutische Möglichkeiten	6
1.2.1 Allogene Stammzelltransplantation (SCT)	6
1.2.2 Konventionelle Therapie	6
1.2.3 Neue Therapieansätze	7
2 Publikationsmanuskript	8
3 Übergreifende Bewertung	16
4 Zusammenfassung	23
5 Literaturverzeichnis	25
6 Anhang	27
6.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	27
6.2 Danksagung	28
6.3 Lebenslauf	29
6.4 Abkürzungsverzeichnis	30

1 Einführung in die Thematik

1.1 Myeloproliferative Neoplasien

Der Begriff der myeloproliferativen Erkrankungen (MPD) wurde erstmalig 1951 von dem Hämatologen William Dameshek erwähnt [1] und umfasste folgende hämatologische Erkrankungen: Polycythaemia vera (PV), essentielle Thrombozythämie (ET), primäre Myelofibrose (PMF) und chronische myeloische Leukämie (CML).

Heute weiß man, dass die Ursache in der malignen Entartung einer pluripotenten Stammzelle mit der Folge klonaler Expansion zu sehen ist [2, 3, 4, 5, 6]. Je nach betroffener Zellreihe sind unterschiedliche Krankheitsbilder definiert (WHO 2008).

1.1.1 Diagnosekriterien der WHO von 2008

Aufgrund ihrer Häufigkeit wurde die JAK2 p.V617F Mutation als diagnostisches Kriterium in die neue Fassung der WHO Diagnosekriterien BCR-ABL negativer myeloproliferativer Neoplasien von 2008 aufgenommen [7, 8].

Bei der Neuformulierung wurde der Begriff der myeloproliferativen Neoplasie (MPN) geprägt. Damit soll deutlich werden, dass es sich um eine definierte maligne Erkrankung handelt. Die Klassifikation nach WHO-Definition von 2008 umfasst neben den unter dem früheren Begriff MPD zusammengefassten Erkrankungen (PV, ET, PMF, CML) außerdem die chronische Neutrophilen- bzw. Eosinophilenleukämie, die Mastzellleukämie und nicht klassifizierbare MPN [8].

Bei Diagnosestellung wird die CML durch den Nachweis des Philadelphia-Chromosoms [9] oder des molekularen Korrelates BCR-ABL charakterisiert und auch als BCR-ABL positive MPN bezeichnet.

Die aktuellen Diagnosekriterien für BCR-ABL negative MPN (PV, ET und PMF) sind in Tabelle 1 dargestellt:

		Polyzythaemia vera (PV)	essentielle Thrombozythämie (ET)	primäre Myelofibrose (PMF)
Hauptkriterien	A1	Hb > 18,5 g/dl (Mann) bzw. > 16,5 g/dl (Frau)	Thrombozytenzahl $\geq 450\,000/\mu\text{l}$	Megakaryozytäre Proliferation und Atypie begleitet von Fibrose
	A2	JAK2 p.V617F oder JAK2 Exon 12 Mutation	Megakaryozytäre Proliferation mit großen und reifen Kernen	Ausschluss von PV, CML oder anderer myeloischer Neoplasien
	A3		Ausschluss von PV, IMF, CML oder anderer myeloischer Neoplasien	JAK2 p.V617F Mutation, anderer klonaler Marker oder Ausschluss reaktiver KM Fibrose
	A4		JAK2 p.V617F Mutation, anderer klonaler Marker oder Ausschluss reaktiver Thrombozytose	
Nebenkriterien	B1	KM mit gesteigerter Erythro-, Granulo- und Megakaryopoese		Leukoerythroblastose
	B2	Erniedrigter EPO-Spiegel		Erhöhte LDH im Serum
	B3	EPO-unabhängiges Wachstum erythroider Kolonien		Palpable Splenomegalie
	B4			Anämie
Diagnose		A1 + A2 + ein Nebenkriterium Oder A1 + zwei Nebenkriterien	A1 + A2 + A3 + A4	A1 + A2 + A3 + zwei Nebenkriterien

Tabelle 1: Akutelle Diagnosekriterien der myeloproliferativen Neoplasien nach WHO 2008. Übersetzt und modifiziert nach [8].

Die PV ist primär durch eine gesteigerte Erythropoese gekennzeichnet [7], die ET durch vermehrte Thrombopoese und die CML weist eine gesteigerte Myelopoese auf. Bei der PMF kommt es zur Fibrose des Knochenmarks. Häufig gibt es Übergänge zwischen den einzelnen Formen [10]. Allen gemeinsam sind aber die Proliferation von Zellen der myeloischen Reihe, eine Splenomegalie sowie der bindegewebige Umbau des Knochenmarks [11].

Auf dem Boden einer MPN kann sich sekundär eine akute myeloische Leukämie (AML) entwickeln [11, 12, 13, 14].

1.1.2 Die JAK2 p.V617F Mutation bei MPN

2005 wurde mit der Entdeckung der Mutation JAK2 p.V617F ein Meilenstein im Verständnis und der Erforschung dieser Erkrankungen gelegt [15, 16, 17, 18]. JAK2 p.V617F ist der häufigste klonale Marker bei MPN und ein wichtiger Bestandteil zur Diagnosestellung von

PV, ET und PMF. Diese Punktmutation wird bei nahezu allen Patienten mit PV sowie in etwa 50% bei Patienten mit ET und PMF gefunden.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die prozentuale Verteilung der JAK2 p.V617F Mutation innerhalb MPN:

MPN	Häufigkeit der JAK2 p.V617F Mutation (%)
PV	76-97
ET	29-57
PMF	50
CML	0

Tabelle 2: Häufigkeit der JAK2 p.V617F Mutation bei MPN [19].

Das JAK2 Protein ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, die Januskinase 2 und Bestandteil von Zytokinrezeptoren. Der JAK2 Rezeptor liegt als Dimer vor und besitzt insgesamt drei Domänen: die JH1-Domäne nahe dem Carboxyl-Ende, die proximale JH2-Domäne ohne Kinasenaktivität (Pseudokinase) sowie eine FERM-Domäne zur Bindung von Liganden [19]. Im inaktiven Zustand wird die JH1 Kinasenaktivität durch die JH2-Domäne inhibiert. Die Aktivierung der Januskinase 2 erfolgt durch Bindung spezieller Liganden (z.B. EPO, TPO, G-CSF) und führt zur Konformationsänderung des Proteins durch Transphosphorylierung. Die JH2-Domäne löst sich von JH1, die Hemmung der JH1-Domäne ist somit aufgehoben [19].

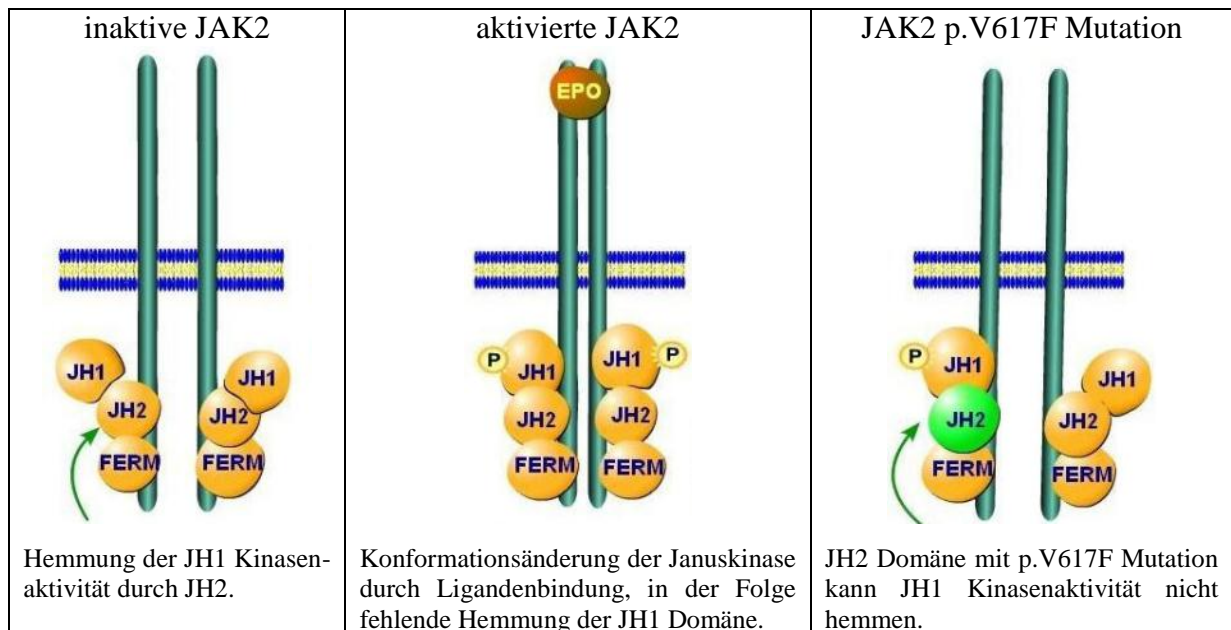


Abbildung 1: Die Domänen der Januskinase 2 im inaktiven und aktivierten Zustand sowie Veränderungen bei Vorhandensein der JAK2 p.V617F Mutation. Übersetzt und modifiziert nach [19].

Das JAK2 Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 lokalisiert [17]. Die Punktmutation JAK2 p.V617F in der JH2-Domäne führt zum Basenaustausch von Guanin gegen Thymin im Nukleotid 1849 (Exon 12) und hat einen Aminosäureaustausch von Valin gegen Phenylalanin im Codon 617 des JAK2 Proteins zur Folge [15, 16-18, 20, 21].

Codon	614	615	616	617	618	619
JAK2 Wildtyp	Gly GGA	Val GTA	Cys TGT	Val GTC	Cys TGT	Gly GGA
JAK2 p.V617F	GGA Gly	GTA Val	TGT Cys	TTC Phe	TGT Cys	GGA Gly

Abbildung 2: Ausschnitt aus dem JAK2 Gen, Exon 12. Darstellung der Basentriplets mit Aminosäureaustausch von Valin gegen Phenylalanin im Codon 617.

Dadurch ist die Hemmung der JH1-Domäne (negative Autoregulation) im inaktiven Zustand aufgehoben und es kommt zur dauerhaften Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege (z.B. STAT) [19]. Die betroffenen blutbildenden Stammzellen weisen eine gesteigerte Zellteilungsrate auf, sie sind unabhängig von der Stimulation durch EPO und zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Wachstumsfaktoren [16-18].

Die Mutation betrifft ausschließlich hämatopoetische Zellen mit Vermehrung innerhalb der myeloischen Reihe und kommt nicht in der Keimbahn vor [17, 18, 22]. Neben der Bedeutung

der JAK2 p.V617F Mutation zur Diagnosestellung BCR-ABL negativer MPN wurde diese auch als prognostischer Faktor für eine Vielzahl von Endpunkten untersucht.

1.1.3 Prognoseabschätzung

Während bei PV und ET die Vermeidung thrombembolischer Komplikationen das primäre Therapieziel darstellt, zeigen Patienten mit PMF eine deutlich eingeschränkte Lebenserwartung [23]. Deshalb ist es insbesondere bei dieser Krankheitsentität notwendig, klinische Risikoscores zur Abschätzung des Überlebens für Therapieentscheidungen zu nutzen.

Als Grundlage der Therapieempfehlungen sind entsprechend der DGHO für die PMF aktuell drei Risikoscores etabliert [24]. Der IPSS-Score (International Prognostic Scoring System) kommt bei Diagnosestellung zur Anwendung und beschreibt das Risiko der Entstehung einer akuten Leukämie. Die entsprechenden Risikofaktoren [25] sind in Tabelle 3 dargestellt und können zu jedem Zeitpunkt während des Krankheitsverlaufes erneut abgeschätzt werden (DIPSS-Score), allerdings mit höherer prognostischer Bedeutsamkeit bei Auftreten einer Anämie [26]. Der DIPSS-Plus-Risikoscore berücksichtigt zusätzliche Faktoren wie Transfusionsbedarf, Thrombozytenzahl und Zytogenetik als Prädiktoren für ein schlechteres Überleben [27].

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Risikoscores zur Prognoseabschätzung und Therapieentscheidung bei PMF:

Risikogruppe	Risikoscore Punktzahl		
	IPSS ^x	DIPPS ^x	DIPSS-Plus ^y
Niedrig	1	0	0
Intermediär-1	2	1-2	1
Intermediär-2	3	3-4	2-3
Hoch	4-5	≥5	≥4
^x Risikofaktoren (Punkte): Alter > 65 Jahre (1), Hb < 10 g/dl (IPSS: 1, DIPSS: 2), Blastenanteil im peripheren Blut ≥ 1% (1), Leukozyten > 25 Gpt/l (1), konstitutionelle Symptome (1) ^y Zusätzlich (je 1 Punkt): Thrombozyten < 100 Gpt/l, Transfusionsbedarf, Hochrisiko-zytogenetik IPSS: International Prognostic Scoring System, DIPSS: dynamisches IPSS			

Tabelle 3: IPSS-, DIPSS- und DIPSS-Plus-Score, übersetzt und modifiziert nach [24-27].

1.2 Therapeutische Möglichkeiten

Es gibt verschiedene therapeutische Optionen zur Behandlung BCR-ABL negativer MPN. Patienten mit PV und ET haben im Vergleich zur Gesamtbevölkerung keinen signifikanten Überlebensunterschied [28], weshalb das primäre Therapieziel die Vermeidung von Komplikationen und Verbesserung klinischer Symptome darstellt. Bei PMF wird die Prognose anhand der oben dargestellten Risikoscores abgeschätzt. In Abhängigkeit von Alter und Risikogruppe kommt für dieses Patientenkollektiv eine allogene Stammzelltransplantation in Frage.

1.2.1 Allogene Stammzelltransplantation (SCT)

Die allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist die einzige Möglichkeit der Kuration bei Patienten mit BCR-ABL negativer MPN [29]. Aufgrund transplantationsassoziiierter Nebenwirkungen und erhöhter Mortalität kommt dieses Verfahren nur bei einem ausgewählten Patientenkollektiv zur Anwendung. Patienten mit PMF und entsprechend Intermediär-Risiko 2 oder Hochrisiko sind potentielle Kandidaten für eine allogene Stammzelltransplantation [25, 26].

Generell können mobilisierte periphere Blutstammzellen, Stammzellen aus Knochenmark oder Nabelschnurblut übertragen werden. Ziel der SCT ist es, das befallene Knochenmark des Patienten durch gesundes Spender-Knochenmark zu ersetzen. Dazu ist zunächst eine sog. zytoreduktive Therapie oder Konditionierung als vorbereitende Phase erforderlich. Dabei wird der Patient einer Behandlung mit Zytostatika evtl. in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung ausgesetzt, um die erkrankten hämatopoetischen Zellen zu zerstören und das Anwachsen des Transplantates zu ermöglichen.

1.2.2 Konventionelle Therapie

Bei BCR-ABL negativen MPN kommt es aufgrund krankheitsbedingter Proliferation peripherer Blutzellen zur Erhöhung der Blutviskosität mit der potentiellen Gefahr einer Thrombose oder Embolie. Entsprechend den aktuellen Leitlinien der DGHO (<http://www.dgho-onkopedia.de>) gilt es bei Patienten mit ET und PV diese Komplikationen zu vermeiden. Dazu können allgemeine Maßnahmen (z.B. Gewichtsreduktion, regelmäßige Bewegung, ausreichend Flüssigkeitszufuhr) ergriffen oder ASS als Thrombozytenaggregationshemmer bei zusätzlichem Vorliegen kardiovaskulärer

Risikofaktoren eingesetzt werden [23, 30]. Bei Hochrisikopatienten (Thrombose in der Anamnese, Alter > 60 Jahre) wird eine Therapie mit ASS und Hydroxyurea empfohlen [23]. Aufgrund der gesteigerten Erythropoese bei PV kommt bei dieser Krankheitsentität zusätzlich die Aderlasstherapie zur Anwendung.

Bei PMF mit niedrigem oder Intermediär-Risiko 1 bei Diagnosestellung (nach IPSS-Score, siehe Tabelle 3) sollte sich zunächst abwartend verhalten und eine Therapie nur bei entsprechend klinischer Symptomatik (z.B. transfusionsbedürftige Anämie, Splenomegalie) eingeleitet werden [23]. Splenomegalie ist ein häufig führendes Symptom, welches zu schwerwiegenden Komplikationen wie Milzruptur oder portaler Hypertension führen kann. Eine medikamentöse Therapie mit Hydroxyurea konnte eine Reduktion der Milzgröße bei etwa 35 % der Patienten zeigen [24].

1.2.3 Neue Therapieansätze

Die zielgerichtete Inhibition der JAK Tyrosinkinase als neuer Therapieansatz wird zukünftig eine große Rolle spielen. Ruxolitinib wurde als erster JAK1/2-Inhibitor für die Behandlung der PMF bereits zugelassen. In zwei Studien zeigte sich unter Ruxolitinib ein Rückgang der Splenomegalie um etwa 40 % sowie eine Verbesserung des Allgemeinzustandes der Patienten unabhängig von Risikostatus, Alter und dem Vorliegen einer JAK2 p.V617F Mutation [23, 31, 32].

Neue Therapiemöglichkeiten entstehen durch Kombination von JAK Inhibitoren mit anderen wirksamen Methoden wie z.B. der Interferontherapie [33, 34]. Eine Vielzahl weiterer Substanzen wird derzeit in klinischen Studien untersucht und könnte zukünftig völlig neue Therapieansätze von MPN ermöglichen.

2 Publikationsmanuskript

JAK2 p.V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms one month after allogeneic stem cell transplantation significantly predicts outcome and risk of relapse.

veröffentlicht in: Haematologica 2013. 98 (5): 722-8

JAK2 p.V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms one month after allogeneic stem cell transplantation significantly predicts outcome and risk of relapse

Thoralf Lange,^{1*} Anja Edelmann,^{1*} Udo Siebolts,² Rainer Krahel,¹ Claudia Nehring,¹ Nadja Jäkel,¹ Michael Cross,¹ Jacqueline Maier,¹ Dietger Niederwieser,¹ and Claudia Wickenhauser²

*Both authors contributed equally to this work

¹Department of Hematology/ Oncology and Hemostaseology, University Hospital of Leipzig, and ²Institute of Pathology, University Hospital of Leipzig, Leipzig, Germany

ABSTRACT

The risk profile and prognosis of patients with myelofibrosis is well described by the Dynamic International Prognostic Scoring System risk categorization. Allogeneic stem cell transplantation is considered for intermediate-2/high risk disease. However, indicators of prognosis after transplantation are still lacking. Seventy simultaneously collected pairs of trephine and blood samples were quantified for JAK2 p.V617F allele burden to compare test sensitivity. The course of 30 patients with JAK2 p.V617F-positive myeloproliferative neoplasia was correlated with allele burden after transplantation. Monitoring can be performed on full blood samples as well as trephine biopsies, provided that techniques with ample sensitivity (0.01 % to 0.001 %) are available. Measurement of allele burden on day 28 after transplantation discriminates two prognostic groups: patients with a JAK2 p.V617F allele burden >1% have a significantly higher risk of relapse of JAK2 p.V617F positive neoplasia ($P=0.04$) and a poorer overall survival ($P<0.01$). In conclusion, measurement of JAK2 p.V617F allele burden early after transplantation is an important predictive parameter in monitoring patients following this treatment. As this might provide an important tool in early management of imminent early relapse it will be important to define consensus guidelines for optimal monitoring.

Introduction

BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) are heterogeneous stem cell disorders with a variable risk of progression to secondary acute leukemia and to bone marrow failure due to bone marrow fibrosis.¹ Allogeneic stem cell transplantation (SCT) is currently the only potentially curative procedure, but is still associated with significant mortality and morbidities.^{2,4} The curative potential of SCT relies heavily on the graft-versus-leukemia effect.^{5,7} This has led over the past decade to the adoption of reduced intensity conditioning SCT and to new curative possibilities even for elderly patients.^{8,9} However, following SCT 30-50% of all patients relapse and most of them die.^{10,11} Immunomodulation by titration of immunosuppression or use of donor lymphocyte infusions has been investigated in different diseases and may provide an option for avoiding hematologic relapse early after SCT.^{14,15} Such interventions, however, are only successful during early relapse and rely on the availability of appropriate techniques for monitoring molecular markers of the underlying disease. To date, molecular monitoring in patients with MPN has been limited, with real-time polymerase chain reaction (qPCR) being the most important tool for determining whether there is minimal residual disease in JAK2 p.V617F positive disease.^{16,17} Standardization of PCR protocols and documentation of adequate sensitivity and specificity for monitoring minimal residual disease in these patients have

been initiated but not yet finalized.

We show here that both quantitative amplification refractory mutation system (ARMS) qPCR and allele-specific wild-type-blocking (AS-WTB) qPCR are sufficiently sensitive for monitoring minimal residual disease in patients with JAK2 p.V617F positive disease and that both methods can be performed on blood samples or bone marrow trephines with comparable results.

Applying these techniques we were able to show that allele burden measurement 28 days after allogeneic SCT was highly predictive of relapse of JAK2 p.V617F positive neoplasia and for overall survival. We, therefore, recommend urgent standardization of MPN monitoring following allogeneic SCT.

Design and Methods

Patients

In a first exploratory study, analyses were performed on samples from 14 patients with JAK2 p.V617F positive MPN and a median age of 61 years (range, 52-70 years) who were transplanted between 2000 and 2008 at the Department of Hematology and Oncology of the University of Leipzig. Patients were selected based on the availability of blood and bone marrow DNA for simultaneous analysis at different time points after allogeneic SCT. Following evaluation of these data, a second group of 16 patients with a comparable

©2013 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2012.076901

Manuscript received on August 29, 2012. Manuscript accepted on December 28, 2012.

Correspondence: claudia.wickenhauser@uniklinik-leipzig.de

JAK2 p.V617F allele burden after SCT in MPN

median age who had been transplanted over the same period, was examined for correlation of the post-transplantation disease course with JAK2 p.V617F allele burden at day 28. The clinical profiles of the patients are shown in Table 1, individual risk profile, MPN subtype and JAK2 p.V617F allele burden prior to SCT are presented in Table 2A/B. Applying the Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) for risk stratification, the patients with primary myelofibrosis (n=16) were classified into either the intermediate-2 risk group or the high risk group. The patients were followed for a median of 43.5 months (range, 20.3 - 104.4 months). All patients gave written informed consent to participation in the study in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the local ethics committee and the national health authorities. Within the first cohort the JAK2 p.V617F allele burden of one patient (UPN6) never exceeded 4%. This patient had an abnormal karyotype and atypical spindle-shaped mast cell aggregates were seen following allogeneic SCT. Together with the molecular pathological finding of a *KIT* p.D816V mutation the disease was identified as systemic mastocytosis associated with a JAK2 p.V617F-positive MPN. The other 13 patients were determined to have classical MPN which in four of them had transformed to secondary acute myeloid leukemia prior to the allogeneic SCT. All patients in the second cohort (n=16) had classical MPN which in seven cases had transformed to secondary AML prior to transplantation. Patients were transplanted due to progression under conventional treatment with at least one of the following features: secondary AML; increased transfusion frequency; pancytopenia or uncontrolled white blood cell counts under therapy.

The success of allogeneic SCT was assessed on the basis of clinical data, cytological, histomorphological and laboratory findings. Relapse was indicated by the reappearance of MPN-typical changes in peripheral blood (i.e. progressive cytopenia, leukerythroblastic blood counts) and/or by clinical symptoms (i.e. increase in splenomegaly, constitutional symptoms) together with characteristic changes in the bone marrow such as progressive fiber density in a trephine biopsy or an increase of atypical blasts in the absence of uncontrolled graft-versus-host disease, graft rejection or poor bone marrow function and infections. Response or remission of MPN was indicated by constant or decreasing spleen size and blood count parameters as well as a return to normal histomorphology.

Samples

For the initial study of 14 patients a total of 70 peripheral blood samples were immediately frozen at -80°C. At the same time as the blood sampling, 76 bone marrow biopsies were obtained from the posterior iliac crest. The biopsies were fixed in phosphate-buffered formaldehyde solution (4%) for 12 h. Further processing included decalcification in 10% buffered ethylene-diamine tetra-acetic acid (EDTA), pH 7.2 for 6 h and embedding in paraffin. Early sampling was carried out at standardized intervals (1 month, 2 months, 3 months) and/or in response to clinical features. Decisions regarding sampling at later time points were based on clinicopathological findings. Overall, from 146 total samples, 142 were analyzed by both molecular assays (see below).

For the subsequent analysis of the 16 patients, JAK2

p.V617F allele burden was tested either in bone marrow biopsies (n=29) or in frozen peripheral blood probes (n=3) prior to and at day 28 after allogeneic SCT.

Reproducibility was demonstrated by performing the assay in quadruplicate at different time points. Concerning the cut-off of 1% JAK2 p.V617F allele burden, the initial classification could be confirmed in every case.

DNA extraction

Total DNA was extracted from peripheral blood cells that had been frozen at -80°C using the DNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

Genomic DNA was isolated from bone marrow biopsies by cutting one to three 8 µm paraffin wax-embedded sections and processing the sections using a DNeasy Micro Kit and QIAcube (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

Amplification refractory mutation system – real-time polymerase chain reaction analysis

This quantitative, allele-specific oligonucleotide PCR assay, established on the principles of the ARMS-qPCR for JAK2 p.V617F mutated allele, was performed on 144 probes (in quadruplicate) as previously described¹⁴ with minor modifications but without the reported additional third-to-last-3' point mutation which resulted in our hands in a cross reactivity to JAK2 p.V617F wild type allele

Table 1. Characteristics of the patients (cohort 1 and cohort 2), stem cell transplants and outcomes.

Patients and disease characteristics	
Male, n. (%)	20 (66)
Age, median, years (range)	59 (35-70)
JAK2 p.V617F+ disease: PV/ PMF/ MPN unclassified, n. (%)	7 (23)/ 20 (67)/ 3 (10)
Disease duration to SCT, median, months (range)	25 (3-132)
Prior chemotherapy other than HU, n. (%)	14 (47)
Transformed to AML, n. (%)	11 (37)
AML disease status prior to SCT CR/ PR, n. (%)	8 (27)/ 3 (10)
Stem cell transplant characteristics (n=30):	
Reduced intensity conditioning*, n. (%)	26 (86)
Conventional intensity conditioning**, n. (%)	4 (13)
Donor: related/ unrelated, n. (%)	11 (37)/ 19 (63)
Graft rejection, n. (%)	4 (13)
Outcome of patients	
Relapse, n. (%)	12+ (40)
Non-relapse mortality, n. (%)	6 (20)
Relapse mortality, n. (%)	10+ (33)
Acute GVHD: grade 1-2/ 3-4, n. (%)	16 (53): 9 (30)/ 6 (20)

JAK2: Janus kinase 2 gene; PV: polycythemia vera; PMF: primary idiopathic myelofibrosis; MPN: myeloproliferative neoplasia; HU: hydroxyurea; AML: acute myeloid leukemia; SCT: stem cell transplantation; CR: complete remission; PR: partial remission; GVHD: graft-versus-host disease. *200 cGy total body irradiation and 3x30 mg/m² fludarabine followed by cyclosporine A and mycophenolate mofetil after SCT in all patients; **1200 cGy total body irradiation (n=3) or oral busulfan 4x4 mg/kg body weight (n=1) and 2x60 mg/kg body weight cyclophosphamide (n=4) followed by cyclosporine A and methotrexate after SCT. Three patients relapsed with JAK2 p.V617F negative AML without any evidence of MPN and all died.

(data not shown). The level of JAK2 p.V617F mutated allele was normalized to that of the *HCK* gene and expressed as JAK2 p.V617F mutated alleles per *HCK* allele to enable quantification. In all JAK2 p.V617F negative samples the *HCK* allele burden was noted separately.

Allele-specific wild-type blocking quantitative real-time polymerase chain reaction

As previously reported¹⁹ the combination of wild-type blocking PCR (employing locked nucleic acid-substituted oligonucleotides and the Taq polymerase Stoffel fragment)

Table 2A. Individual outcomes as a function of JAK2 status, observation period and age. Patients with JAK2 p.V617F allele burden >1%.

UPN	Age	MPN subtype	Pretreatment prior to allo-SCT	JAK2 allele burden prior to allo-SCT	sAML prior to allo-SCT	DIPSS score	Cytogenetics	Time point incident (years)	Overall survival (years)	Status at end of observation period	
			0 - no pretreatment 1 - pretreatment	0 - <5% 1 - 5-49% 2 - ≥49%	0 - no sAML 1 - JAK2+ sAML 2 - JAK2- sAML	HR - High risk IM2 - Intermediate risk 2	0 - normal karyotype 1 - non-tetraploid 2 - tetraploid			0 - remission 1 - TRM 2 - JAK2+ MPN relapse 3 - JAK2- AML relapse	0 - alive 1 - dead
1	58	PV	1	2	0	na	0	0.621	0.679	2	1
2	73	PV	1	2	2	na	0	0.706	0.986	2	1
4	74	PMF	0	1	0	IM2	0	0.643	0.643	1	1
5	69	PMF	0	1	0	IM2	0	0.181	2.311	2	1
7	70	PMF	0	2	1	HR	0	0.077	0.164	2	1
9	62	PMF	1	1	0	IM2	1	0.490	1.473	2	1
13	67	PMF	0	1	2	HR	1	3.140	3.140	0	0
17	63	PMF	1	1	1	HR	0	3.633	3.633	0	0
19	67	MPN NOS	1	2	0	na	0	8.739	8.739	0	0
20	74	MPN NOS	1	1	1	na	0	0.578	0.578	1	1
21	62	PMF	0	1	0	IM2	0	0.214	0.589	2	1
23	71	PMF	0	1	0	IM2	0	0.271	0.271	1	1
25	72	PMF	1	1	1	HR	0	0.266	0.266	1	1
26	38	PMF	1	1	2	HR	1	0.233	0.528	3	1
27	41	PMF	0	1	0	HR	1	0.246	1.068	2	1

JAK2: Janus kinase 2 gene; PV: polycythemia vera; PMF: primary idiopathic myelofibrosis; MPN NOS: myeloproliferative neoplasia not otherwise specified; sAML: secondary acute myeloid leukemia; SCT: stem cell transplantation; DIPSS score: Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis; IM2: intermediate risk 2; HR: high risk; na: not available; allo-SCT: allogeneic stem cell transplantation.

Table 2B. Individual outcomes as a function of JAK2 status, observation period and age. Patients with JAK2 p.V617F allele burden ≤1%.

Upn	Age	MPN subtype	Pretreatment prior to allo-SCT	JAK2 allele burden prior to allo-SCT	sAML prior to allo-SCT	DIPSS score	Cytogenetics	Time point incident (years)	Overall survival (years)	Status at end of observation period	
			0 - no pretreatment 1 - pretreatment	0 - <5% 1 - 5-49% 2 - ≥49%	0 - no sAML 1 - JAK2+ sAML 2 - JAK2- sAML	HR - High risk IM2 - Intermediate risk 2	0 - normal karyotype 1 - non-tetraploid 2 - tetraploid			0 - remission 1 - TRM 2 - JAK2+ MPN relapse 3 - JAK2- AML relapse	0 - alive 1 - dead
3	63	PMF	0	1	0	HR	0	3.129	3.129	0	0
6	60	MPN NOS	0	0	0	na	1	0.353	1.024	2	1
8	78	PV	1	2	2	na	0	0.156	0.156	1	1
10	67	PMF	1	2	0	IM2	1	4.802	4.802	0	0
11	67	PMF	0	1	0	IM2	0	0.148	0.148	1	1
12	72	PMF	0	1	0	IM2	0	3.745	3.745	0	0
14	74	PV	1	1	2	na	0	1.067	1.175	3	1
15	51	PV	0	2	0	na	0	3.737	3.737	0	0
16	60	MPN NOS	1	2	0	na	0	5.585	5.585	0	0
18	70	PMF	0	1	0	na	0	8.041	8.041	0	0
22	62	PMF	0	1	0	na	0	1.265	1.265	0	0
24	64	PV	1	2	0	na	0	3.206	3.206	2	0
28	63	PV	1	2	1	na	0	1.188	1.188	0	0
29	68	PMF	1	1	0	IM2	0	0.517	1.802	3	1
30	60	PV	1	1	2	na	1	1.749	1.749	0	0

JAK2: Janus kinase 2 gene; PV: polycythemia vera; PMF: primary idiopathic myelofibrosis; MPN NOS: myeloproliferative neoplasia not otherwise specified; sAML: secondary acute myeloid leukemia; SCT: stem cell transplantation; DIPSS score: Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis; IM2: intermediate risk 2; HR: high risk; na: not available; allo-SCT: allogeneic stem cell transplantation.

with allele-specific qPCR results in a two-step procedure combining high sensitivity with robustness. While the sensitivity of the AS-qPCR approach is around 1%, that of AS-WTB qPCR achieves a sensitivity of at least 0.001%. This assay can, therefore, be used to determine values around the cut-off of 1% very accurately. A total of 144 samples from the first cohort and a further 32 samples from the second cohort were analyzed with this method (in quadruplicate).

Statistical analysis

Endpoints were overall survival and incidence of JAK2 p.V617F-positive relapse. The characteristics of patients were expressed as median and range for continuous variables and frequencies for categorical variables. Categorical data were compared by Fisher's exact test or the χ^2 test. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method and were compared using the log-rank test. The Gray test was used to compare cumulative incidence curves. JAK2 p.V617F allele burden on day 28 after allogeneic SCT was included in univariate analysis. The calculations were performed with SPSS version 20 and with the statistical software environment R, version 2.13.1, using the R package cmprsk.

Results

Comparison of two allele-specific polymerase chain reaction amplification methods

The two allele-specific assays described above were tested together in 70 peripheral blood and 72 bone marrow biopsy samples. All investigations were performed in quadruplicate at different time points.

The results revealed a high degree of consistency. When the categories negative, positive with JAK2 p.V617F $\leq 1\%$, and JAK2 p.V617F $> 1\%$ were considered separately, 73% of all values showed a complete match in both assays. In 6% of the samples, the differences were due to inconsistent discrimination of the categories \leq and $> 1\%$ by the two assays and in these cases the higher value was counted. In 19% of the samples JAK2 p.V617F was detected only by AS-WTB qPCR and in 2% of the samples only by ARMS-qPCR indicating a slightly higher sensitivity for the AS-WTB qPCR.

Comparison of JAK2 p.V617F allele burden in simultaneously taken peripheral blood and bone marrow samples

In order to select the optimal haematopoietic compartment for minimal residual disease analysis, molecular monitoring was carried out using bone marrow biopsies

and peripheral blood samples taken at the same time point. Importantly, there was absolute agreement between the samples (100%) in the category JAK2 p.V617F allele burden $> 1\%$. Further results are shown in Table 3. We conclude that both peripheral blood and bone marrow biopsy are appropriate for minimal residual disease monitoring after allogeneic SCT as the prognostically important differentiation into high ($> 1\%$) and low ($\leq 1\%$) allele burden was possible in every case.

Patients' clinical outcome

Following allogeneic SCT 12 of 30 patients were still alive without hematologic neoplasia at the end of the observation period. Four patients experienced primary graft failure, defined as $< 10\%$ donor T-cell chimerism at day 28 post-transplantation. Two of them had a hematologic relapse and two died of transplant-related causes 2 to 7 months after the allogeneic transplant. Two patients died of graft-versus-host disease, related infection and sudden death 8 and 2 months after allogeneic SCT, respectively. The median follow-up of the remaining 24 patients was 32.1 months (range, 1.9-104.2 months). Altogether nine patients developed a hematologic relapse of the MPN, as defined above, in a median of 8.0 months (range, 0.8-38.5 months) after allogeneic SCT and seven patients died. Three patients relapsed with secondary AML in the absence of MPN and died (see Tables 1 and 2A,B).

Correlation of overall survival and molecular follow-up following allogeneic stem cell transplantation

JAK2 p.V617F allele burden prior to allogeneic SCT was quantified by ARMS-qPCR in all patients. At this assessment, the JAK2 p.V617F allele burden ranged from 15 to 85%, except in two patients: patient UPN 12 had only a single sample tested 8 days prior to transplantation and in this sample the JAK2 p.V617F burden was 1.3% by ARMS-qPCR, while in patient UPN 6 the JAK2 p.V617F allele burden prior to allogeneic SCT never exceeded 5%. This patient was diagnosed with systemic mastocytosis with an associated JAK2 p.V617F-positive MPN, carried a *KIT* p.D816V mutation and had multiple karyotypic aberrations.

In the first cohort of 14 patients molecular monitoring was performed using both methods on days 28, 56 and 84 post-transplantation. No molecular response was detected in the two patients with graft rejection. One of these patients (UPN 8) who died of transplant-related causes achieved intermittent molecular negativity, defined as undetectable JAK2 p.V617F alleles by both techniques. The other patient (UPN 4) consistently showed a significant JAK2 p.V617F allele burden with values above 1% but did not develop a clinical/hematologic relapse as defined above.

When patients were separated on the basis of JAK2 p.V617F allele burden, values $> 1\%$ on day 28 after transplantation were seen in seven patients, six of whom died due to relapse ($n=4$), disease persistence with graft rejection ($n=1$) or transplant-related causes with significant persistence of JAK2 p.V617F but no hematologic relapse ($n=1$). In the single patient who survived (UPN 13), significant persistence of JAK2 p.V617F alleles with intermittent values $> 1\%$ was seen until month 6 after SCT. Thereafter, the JAK2 p.V617F burden declined to values $\leq 1\%$ and spleen size normalized. No evidence was found of hematologic disease recurrence. On the other hand, of the seven

Table 3. Comparison of 70 simultaneously analyzed sample pairs (WTB-AS qPCR and ARMS qPCR).

	categories	Blood negative	JAK2 V617F $\leq 1\%$	JAK2 V617F $> 1\%$
Bone marrow biopsy	negative	15%	1%	0%
	JAK2 V617F $\leq 1\%$	5%	43%	0%
	JAK2 V617F $> 1\%$	0%	0%	36%

WTBAS qPCR: wild-type blocking quantitative real-time PCR; ARMS qPCR: amplification refractory mutation system quantitative real-time PCR; Bold fonts represent completely matched results in the respective categories.

patients in whom the *JAK2* p.V617F allele burden was $\leq 1\%$ on day 28 after allogeneic SCT, six became molecularly negative during the observation period (conversion 2–26 months post-SCT) with undetectable *JAK2* p.V617F alleles by both techniques at least at one time point. Four patients remained in hematologic remission of their MPN although one of these patients (UPN 14) experienced relapse of secondary *JAK2* p.V617F-negative AML. Patient UPN 8 achieved intermittent molecular negativity but died of treatment-related causes. Patient UPN 6 already had a low *JAK2* p.V617F allele burden prior to allogeneic SCT and demonstrated molecular negativity at day 40 and day 150, but died with hematologic relapse of complex MPN on day 372. Taken together, all patients who engrafted after allogeneic SCT exhibited episodes of molecular negativity if their *JAK2* p.V617F allele burden was $< 1\%$ one month after SCT.

Encouraged by these results, we proceeded to analyze a second cohort of 16 patients transplanted over the same time period. These patients were grouped on the basis of allele burden ($>$ or $\leq 1\%$) on day 28 after allogeneic SCT. Among this cohort, three patients relapsed and one patient died 7 months after transplantation. Two further patients relapsed with secondary *JAK2* p.V617F-negative AML 6 and 21 months after their allogeneic SCT. Three patients died from transplant-related causes without evidence of MPN. Ten patients remain alive. Further details are given in Table 2A,B. Considering all patients together, the overall survival was significantly higher in the group with a low allele burden ($P < 0.01$) indicating that two prognostic groups can successfully be discriminated based on this parameter (see also Figure 1). In contrast, univariate analysis revealed that MPN subtype, DIPSS score, initial *JAK2* p.V617F allele burden, patient's age and pretreatment did not have a significant influence on survival of the patients.

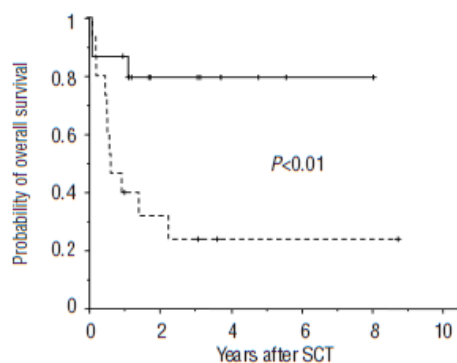


Figure 1. Overall survival according to the presence or absence of the risk factor *JAK2* p.V617F allele burden $> 1\%$ at day 28 after allogeneic SCT: 15 patients were grouped in the low-risk arm (continuous line), 15 patients in the high-risk arm (dashed line).

Probability of *JAK2* p.V617F-positive relapse according to the allele burden on day 28 after transplantation

To further evaluate the impact of allele burden for the prediction of relapse of *JAK2* p.V617F-positive MPN, the patients' course was analyzed in more depth. Only the *JAK2* p.V617F diseases were considered, with *JAK2* p.V617F-negative AML being excluded.

Nine of the 30 patients developed a *JAK2* p.V617F-positive relapse during a median follow-up of 32.1 months (range, 1.9–104.2 months) after SCT. Again, most of the patients ($n=7$) were grouped in the cohort with an allele burden $> 1\%$. The patient suffering from systemic mastocytosis with associated clonal hematologic non-mast-cell lineage and with only a low allele burden ($< 5\%$) preceding allogeneic SCT relapsed 4.2 months after the transplant. The other patient relapsed, after a long disease-free interval, 38.4 months after SCT (Table 2A,B). Prediction of MPN relapse on the basis of *JAK2* p.V617F allele burden on day 28 was significant ($P=0.04$; Figure 2). Again, univariate analysis revealed no significant influence of MPN subtype, DIPSS score, initial *JAK2* p.V617F allele burden, patient's age or pretreatment on survival of the patients.

Discussion

In 2007 Kroger *et al.* observed that in 90% of all successfully treated patients with *JAK2* p.V617F MPN, *JAK2* p.V617F remained negative after a median follow-up of 20 months with *JAK2* p.V617F status converting after a median of 89 days.¹⁴ In a more extensive cohort of patients, this group further demonstrated that achievement of *JAK2* p.V617F clearance after allogeneic SCT was significantly associated with a decreased incidence of relapse.² Although these studies were undoubtedly seminal, many questions still remain: (i) how important is the quantifica-

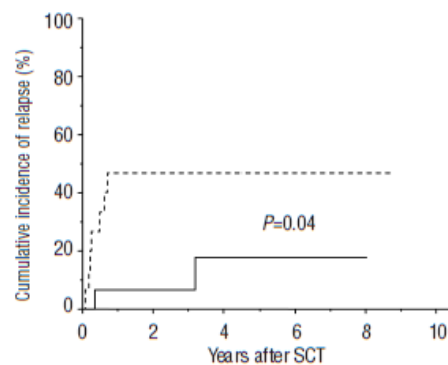


Figure 2. Probability of *JAK2* p.V617F positive relapse according to the presence or absence of the risk factor *JAK2* p.V617F allele burden $> 1\%$ at day 28 after allogeneic SCT: 15 patients were grouped in the low-risk arm (continuous line), 15 patients in the high-risk arm (dashed line).

tion of JAK2 p.V617F allele burden before and after allogeneic SCT and what are the sensitivity and robustness requirements for the PCR amplification procedures? (ii) is monitoring of peripheral blood samples sufficient for molecular monitoring? (iii) can we define a critical time point and a critical level of allele burden for predicting the patients' course and outcome after allogeneic SCT? (iv) does post-transplant monitoring of JAK2 p.V617F allele burden have the potential to provide additional information not available from assessment of prognostic factors prior to allogeneic SCT?

To answer these questions we employed two previously described PCR amplification procedures with complementary strengths.^{14,18} The AS-WTB qPCR enables detection of JAK2 p.V617F down to trace levels after effective blocking of the wild-type allele. Semiquantitative analysis is possible since we know that AS-qPCR alone has a sensitivity of 1% and we can, therefore, conclude that positivity revealed solely with the AS-WTB qPCR indicates a level of mutated allele of less than 1%. The ARMS-qPCR is clearly superior for the quantification of allele burden but is less sensitive. As demonstrated here, the simultaneous analysis employing both assays provides a high level of sensitivity and diagnostic confidence.

Armed with these techniques we compared concurrently obtained peripheral blood and bone marrow biopsies for allele burden at defined time points. Here, we found that data concerning the discrimination of allele burden (>1% and ≤1%) matched perfectly and that molecular monitoring can be performed on peripheral blood. In this context it is important to emphasize that we employed exclusively anticoagulated full blood probes. Selection of granulocytes did not seem to be needed for routine molecular follow-up, as suggested by others.^{14,20}

We then analyzed a cohort of 14 patients who underwent allogeneic SCT due to JAK2 p.V617F-positive MPN. To our surprise a critical JAK2 p.V617F allele burden of 1% on day 28 after allogeneic SCT distinguished two groups with clearly different outcomes and different risks of JAK2 p.V617F-positive MPN relapse. We next analyzed a further 16 patients and rechecked these findings in the whole group. In this analysis we found that a JAK2 p.V617F allele burden ≤1% on day 28 predicted a significantly higher overall survival and lower relapse risk of JAK2 p.V617F-positive MPN compared to those of patients with an allele burden >1% at this time point. Specifically, of the 15 patients with an allele burden ≤1% on day 28, only two experienced JAK2 p.V617F-positive relapses. One of these patients had a systemic mastocy-

tosis with an associated JAK2 p.V617F-positive MPN and a JAK2 p.V617F allele burden that never exceeded 5% prior to SCT. We conclude that the accuracy of allele burden quantification as a prognostic marker can be increased still further when quantitative molecular data preceding allogeneic SCT are taken into account. The other patient developed a relapse of JAK2 p.V617F-positive MPN more than 3 years after allogeneic SCT following a long interval of molecular negativity. As the mechanisms leading to relapse differ in the early and later stages after allogeneic SCT, it is possible that the allele burden cutoff used in this study may prove to be less applicable for late relapse.

In recent years, several studies have clearly shown that a prognostic scoring system for MPN can predict the course of individual patients.^{21,22} Furthermore, several recently published studies suggest that post-transplant success is also dependent on pre-transplant DIPSS classification.^{13,23,24} Since DIPSS is only useful for primary myelofibrosis, while allogeneic SCT in our case was considered solely for intermediate-2/ high-risk primary myelofibrosis or other high-risk MPN, we cannot confirm DIPSS as a predictive parameter for survival in our cohort of patients, 53% of whom suffered from primary myelofibrosis.

It should also be noted that our findings are relevant to estimating the risk of JAK2 p.V617F-positive MPN relapse and clearly cannot detect JAK2 p.V617F-negative secondary AML.

On the basis of risk identification, a reduction of immunosuppressive therapy or administration of donor lymphocyte infusions could be considered in high-risk cases at the stage of molecular relapse because these patients may benefit from a strong graft-versus-tumor effect. Similarly, immunosuppressive therapy could be tailored to minimize the risk of graft-versus-host disease as appropriate. As the JAK2 p.V617F allele burden also stratifies two groups with significantly different overall survival rates, it is possible that the adoption of further supportive measures might help to improve outcome in the cohort of patients with the less favorable outcome.

Acknowledgments

The authors would like to thank Juergen Thiele for his constant support.

Authorship and Disclosures

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at www.haematologica.org.

References

- Campbell BJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2452-66.
- Alchalby H, Badbaran A, Zabelina T, Kobbe G, Hahn J, Wolff D, et al. Impact of JAK2V617F mutation status, allele burden, and clearance after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood*. 2010;116(18):3572-81.
- Kroger N, Zabelina T, Schieder H, Panse J, Ayuk E, Stute N, et al. Pilot study of reduced-intensity conditioning followed by allogeneic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2005;128(5):690-7.
- Tefferi A, Barosi G, Mesa RA, Cervantes F, Deeg HJ, Reilly JT, et al. International Working Group (IWG) consensus criteria for treatment response in myelofibrosis with myeloid metaplasia, for the IWG for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT). *Blood*. 2006;108(5):1497-503.
- Weiden PL, Sullivan KM, Floumoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1981;304(25):1529-33.
- Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, et al. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995;86(5):2041-50.
- Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, Witherspoon RE, Fefer A, Fisher L, et al. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood*. 1989;73(6):1720-8.
- Barrett J, Childs R. Non-myeloablative stem cell transplants. *Br J Haematol*. 2000;111(1):6-17.
- Craddock C. Nonmyeloablative stem cell

- transplants. *Curr Opin Hematol.* 1999;5(6):585-7.
10. Lim Z, Brand R, Martino R, van Biezen A, Finke J, Bacigalupo A, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for patients 50 years or older with myelodysplastic syndromes or secondary acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2010;28(5):405-11.
 11. Sandmaier BM, McSweeney F, Yu C, Storb R. Nonmyeloablative transplants: preclinical and clinical results. *Semin Oncol.* 2000;27(2 Suppl 5):78-81.
 12. Scott BL, Gooley TA, Sorror ML, Rezvani AR, Linenberger ML, Grim J, et al. The Dynamic International Prognostic Scoring System for myelofibrosis predicts outcomes after hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 2012;119(11):2657-64.
 13. Patriarca F, Bacigalupo A, Sperotto A, Isola M, Soldano F, Bruno B, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelofibrosis: the 20-year experience of the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica.* 2008;93(10):1514-22.
 14. Kroger N, Badhman A, Holler E, Hahn J, Kobbe G, Bornhauser M, et al. Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood.* 2007;109(5):1316-21.
 15. Schmid C, Schleuning M, Schwerdtfeger R, Hertenstein B, Mischak-Weissinger E, Bunjes D, et al. Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2006;108(5):1092-9.
 16. Steckel NK, Koldenhoff M, Ditschkowski M, Beelen DW, Elmaagachi AH. Use of the activating gene mutation of the tyrosine kinase (VAL617Phe) JAK2 as a minimal residual disease marker in patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation.* 2007;83(11):1518-20.
 17. Fiorini A, Reddick G, Farina G, Marietti S, Palladino M, Chiusolo P, et al. Eradication of JAK2 V617F mutation after allogeneic transplantation in a patient with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leukemia.* 2006;20(12):2198-9.
 18. Siebels U, Lange T, Niederwieser D, Wickenhauser C. Allele-specific wild-type blocker quantitative PCR for highly sensitive detection of rare JAK2 p.V617F point mutation in primary myelofibrosis as an appropriate tool for the monitoring of molecular remission following therapy. *J Clin Pathol.* 2010;63(4):370-2.
 19. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood.* 2007;110(12):4030-6.
 20. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchetti M, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood.* 2007;110(5):840-6.
 21. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood.* 2009;113(15):2895-901.
 22. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood.* 2010;115(9):1706-8.
 23. Akhaly H, Yunus DR, Zabelina T, Kobbe G, Holler E, Bornhauser M, et al. Risk models predicting survival after reduced-intensity transplantation for myelofibrosis. *Br J Haematol.* 2012;157(1):75-85.
 24. Ditschkowski M, Elmaagachi AH, Trensche R, Gromke T, Steckel NK, Koldenhoff M, et al. Dynamic international prognostic scoring system scores, pre-transplant therapy and chronic graft-versus-host disease determine outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Haematologica.* 2012;97(10):1574-81.

3 Übergreifende Bewertung

Mit dem Nachweis der JAK2 p.V617F Punktmutation wurde nicht nur ein wichtiges Hilfsmittel in der initialen Diagnostik von MPN, sondern außerdem die Grundlage zur Verlaufskontrolle dieser Patienten nach allogener SCT geschaffen.

Die JAK2 p.V617F Mutation findet sich am häufigsten bei Patienten mit PV, ist jedoch keinesfalls spezifisch und kann ebenfalls bei ET und PMF nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2).

Ziel dieser Arbeit war es, eine möglichst sensitive Methode zur Quantifizierung der JAK2 p.V617F Allele nach SCT zu entwickeln. Dafür etablierten wir eine quantitative Mutationsanalyse nach dem Prinzip der allel-spezifischen PCR (ARMS-QPCR) und verglichen diese Methode mit der bereits beschriebenen allel-spezifischen PCR mit Wildtyp Blockade (WTB-AS QPCR) [35].

Bei der ARMS-QPCR binden nur komplementäre Oligonukleotide an eine Einzelstrangsequenz und können Ausgangspunkt der Polymerasekettenreaktion sein. Bei einer Mutation mit Austausch einer einzelnen Base kann das ursprüngliche Oligonukleotid der Normalsequenz nicht mehr ausreichend binden, um die PCR zu starten. Es liegt dann eine Amplifikations-resistente Mutation (ARMS) vor. Der ARMS Primer ist so verändert, dass er am 3'Ende eine Base trägt, die dem Allelzustand der ausgetauschten Base bei einer Mutation entspricht. Der ARMS Primer bindet also an die Mutation und führt zur Amplifikation.

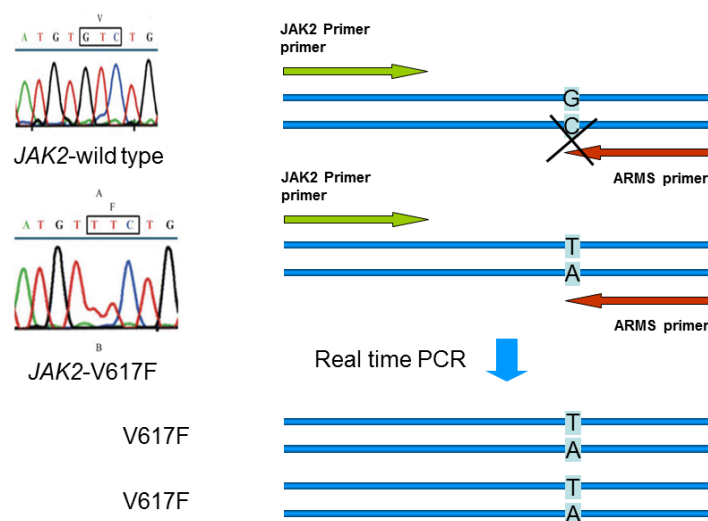


Abbildung 3: Prinzip der ARMS PCR (Amplification Refractory Mutation System)

Folgende Primer und Sonden kamen zur Detektion von JAK2 Wildtyp zum Einsatz:

JAK2 p.V617F-F (forward Primer) 5' TTA TGG ACA ACA GTC AAA CAA CAA TTC 3'

JAK2 wt-R (reverse Primer) 5' CTT ACT CTC GTC TCC ACA GAC 3'

FAM Sonde 5' TTG TAC TTT TTT TTT TCC TTA GTC TTT CTT TGA AGC AGC A 3'

EF094945 Homo sapiens Janus kinase 2 gene, exon 12 and partial cds
wildtype sequence [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]

```
CTTTATTATGGCAGAGAGAATTTTCTGAACTATTTATGGACAACAGTCAAACAACAATTC TTGTACTTT
                                Jak2-F TTATGGACAACAGTCAAACAACAATTC TTGTACTTT

TTTTTTTCCTTAGTCTTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGATGAGCAAGCTTTCTCACAAGCATTTGGTTTTA
TTTTTTTCCTTAGTCTTTCTTTGAAGCAGCA

AATTATGGAGTATGTCTGTGGAGACGAGAGTAAGTAAACTACAGGCTTTCTAATGCCTTTCTCAGAG
                                CAGACACCTCTGCTCTCATTC Jak2 wt-R

CATCTGTTTTTGTATATAGAAAATTCAGTTTCAGGATCACAGCTAGGTGTCAGTGTAAGTATAATTT
AACAGGAGTTAAGTATTTTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
AGCAATGAAGTTAAAGTAGAAGGTT
```

Abbildung 5: Gen der Januskinase 2, Exon 12, Wildtyp mit Position der Primer JAK2 p.V617F-F und JAK2 wt-R

Zur Entwicklung von Real-time PCR Standards für die JAK2 p.V617F Mutation führten wir eine Klonierung für JAK2 p.V617F, JAK2 Wildtyp und das Referenzgen HCK durch, um eine definierte Menge JAK2 p.V617F mutierter Allele herzustellen und diese als Standardreihe mitführen zu können. Zur Klonierung wurde der pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO[®] TA Expression Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) verwendet. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

Die Real-Time PCR wird letztlich unter Verwendung der o.g. Primer durchgeführt:

Detektion von JAK2 p.V617F: JAK2 p.V617F-F (forward Primer)
JAK2 p.V617F-R2 (reverse Primer)

Detektion von JAK2 Wildtyp: JAK2 p.V617F-F (forward Primer)
JAK2 wt-R (reverse Primer)

In den ersten Analysen traten inakzeptable Amplifikationen von JAK2 p.V617F mutierter DNA durch den reversen Wildtyp-Primer JAK2 wt-R auf. Deshalb wurde ein alternativer reverse Primer entwickelt und als JAK2 total bezeichnet, der genau eine Base vor der Mutation (5') endet und sowohl JAK2 p.V617F als auch den Wildtyp der Januskinase 2

erfasst (siehe Abbildung 6). Dieser Primer zeigte eine niedrige Kreuzreaktivität und wurde nun in der Real-Time PCR eingesetzt:

JAK2 total (reverse Primer): 5' ACA TAC TCC ATA ATT TAA AAC CA 3'

EF094945 Homo sapiens Janus kinase 2 gene, exon 12 and partial cds
wildtype sequence [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]

```

CTTTATTATGGCAGAGAGAATTTTCTGAACTATTTATGGACAACAGTCAAACAACAATTC TTGTACTTT
                                Jak2-F TTATGGACAACAGTCAAACAACAATTC TTGTACTTT

TTTTTTTCCTTAGTCTTTCTTTGAAGCAGCAAGTATGATGAGCAAGCTTTCTCACAAGCATTTGGTTTTTA
TTTTTTTCCTTAGTCTTTCTTTGAAGCAGCA                                ACCAAAAT

AATTATGGAGTATGTCTCTGTGGAGACGAGAGTAAGTAAACTACAGGCTTTCTAATGCCTTTCTCAGAG
                                CAGACACCTCTGCTCTCATTC Jak2 wt-R
TTAATACCTCATACA Jak2 total

CATCTGTTTTTGTGTTATATAGAAAATTCAGTTTCAGGATCACAGCTAGGTGTCAGTGTAAGTATAATTT
AACAGGAGTTAAGTATTTTTGAACTGAAAACACTGTAGGACTATTCAGTTATATCTTGTGAAAAAGGAA
AGCAATGAAGTTAAAAGTAGAAGGTT

```

Abbildung 6: Gen der Januskinase 2, Exon 12, Wildtyp mit Position der reverse Primer JAK2 wt-R und JAK2 total

Nach dieser und anderen Optimierungen der ARMS-QPCR erreichen wir eine Sensitivität von maximal 0,1% JAK2 p.V617F mutierter Allele/HCK mit einem dynamischen (quantitativen) Messbereich von 3 logarithmischen Stufen. Die ARMS-QPCR erreicht einen inter- und intra-Assay Variationskoeffizient von 0,04 und 0,02.

Die Vergleichsmethode in dieser Arbeit WTB-AS QPCR erreicht eine höhere Sensitivität (ca. 0,01%). Diese wird durch die Verwendung spezieller Sonden sowie des Taq-Polymerase Stoffel-Fragments erreicht, wodurch die Amplifikation der Wildtyp-DNA nahezu verhindert wird [35]. Allerdings ist ab 1% mutiertem Allel nur noch eine qualitative Aussage möglich, was den dynamischen Messbereich auf 2 logarithmische Stufen begrenzt.

	ARMS-QPCR	WTB-AS QPCR
Sensitivität [%]	0,1	0,01
quantitativer Messbereich [%]	100-0,1	100-1

Tabelle 4: Vergleich ARMS-QPCR und WTB-AS QPCR

Von allen Patienten erfolgte nun eine Quantifizierung der JAK2 Allele vor und nach SCT durch beide Methoden in Blutproben bzw. Beckenkammbiopsien. Diese wurden zu definierten Zeitpunkten (28, 56 und 84 Tage nach SCT) entnommen und asserviert. Wir stellten uns die Frage, welches hämatologische Kompartiment zur molekularen Verlaufskontrolle am besten geeignet ist und ob zwingend Beckenkammbiopsien zur Verlaufskontrolle durchzuführen sind. Dazu untersuchten wir 70 parallel entnommene Blutproben und Beckenkammbiopsien mit ARMS-QPCR und WTB-AS QPCR. Unsere Daten zeigen, dass Blutproben und Beckenkammbiopsien in beiden allel-spezifischen Amplifikationsverfahren gleichwertige Ergebnisse erzielten. Alle Proben aus peripherem Blut mit einem quantitativen Ergebnis von $> 1\%$ JAK2 p.V617F wurden auch in den parallelen Beckenkammbiopsien als $> 1\%$ bewertet. Wir schlussfolgern, dass beide hämatologischen Kompartimente zur molekularen Verlaufskontrolle nach allogener SCT geeignet sind, da die diagnostisch wichtige Differenzierung in ein hohes ($> 1\%$) und niedriges ($\leq 1\%$) JAK2 p.V617F Vorkommen in jedem Fall möglich war. Zukünftig ist also die Verwendung von antikoaguliertem Vollblut zur quantitativen Bestimmung von JAK2 p.V617F mutiertem Allel als Verlaufskontrolle ausreichend, welches bei Routinebestimmungen die invasivere Beckenkammbiopsie ersetzen kann. Wenn allerdings der Verdacht auf ein Rezidiv der Erkrankung besteht oder die Beurteilung der Hämatopoese erfolgen soll, ist weiterhin eine Beckenkammbiopsie erforderlich.

Wir analysierten weiterhin 142 Proben von 14 Patienten als Doppelbestimmung, um beide PCR-Methoden zu vergleichen. Von allen Patienten wurden Proben vor und nach allogener SCT untersucht.

Vor SCT lag der maximale JAK2 p.V617F Allel-Nachweis bei allen bis auf zwei Patienten zwischen 15-85%. Bei einem Patienten (UPN 12) war nur eine Probe acht Tage vor SCT verfügbar, in der wir 1,3% JAK2 mutierte Allele mittels ARMS-QPCR nachweisen konnten. Wir gehen davon aus, dass dies bereits auf eine erfolgreiche Reduktion neoplastischer Klone vor SCT hindeutet. Der Patient mit UPN 6 wies eine komplexe MPN auf, da er zusätzlich die KIT D816V Mutation trug und zeigte vor SCT maximal 5% JAK2 p.V617F in der ARMS-QPCR.

Wir kategorisierten die Allellast nach SCT mit $> 1\%$ und $\leq 1\%$ und korrelierten diese Ergebnisse mit Rezidivinzidenz und Gesamtüberleben der Patienten. Erstaunlicherweise zeigt sich schon am Tag 28 nach SCT ein Zusammenhang zwischen JAK2 p.V617F Allellast und dem Auftreten von Rezidiven.

In einer ersten Kohorte von 14 Patienten zeigten 7 Patienten einen Nachweis von JAK2 p.V617F $> 1\%$ am Tag 28 nach allogener SCT. Davon verstarben 6 Patienten aufgrund eines hämatologischen Rezidivs (n=4), Transplantatabstoßung (n=1) oder im Zusammenhang mit der Therapie (n=1). Der einzige Patient, der überlebte (UPN 13), zeigte eine signifikante Persistenz von JAK2 p.V617F $> 1\%$ bis 6 Monate nach SCT. Erst danach kam es zum Abfall $\leq 1\%$, einhergehend mit einer regredienten Splenomegalie. Bis dato gibt es für diesen Patienten keinen Anhalt für das Wiederauftreten einer hämatologischen Erkrankung.

Bei den anderen 7 Patienten ließ sich JAK2 p.V617F $\leq 1\%$ einen Monat nach SCT nachweisen. Im Verlauf konnten bei sechs Patienten 2-26 Monate nach SCT molekular keine JAK2 p.V617F Allele mehr nachgewiesen werden, fünf Patienten verblieben in hämatologischer Remission. Ein Patient (UPN 14) entwickelte eine sekundäre AML ohne Nachweis der JAK2 Mutation, ein anderer (UPN 8) verstarb aufgrund Therapie-assoziiierter Ursachen. Der bereits oben erwähnte Patient mit komplexer MPN (UPN 6) zeigte schon vor SCT ein geringes JAK2 p.V617F Vorkommen und entwickelte molekulare Negativität am Tag 40 und 150, verstarb aber dennoch aufgrund eines hämatologischen Rezidivs mit Positivität von JAK2 p.V617F am Tag 372 nach SCT. Dieser Patient lässt vermuten, dass die molekularen Verlaufsuntersuchungen bei Patienten mit initial niedriger Allellast weniger aussagekräftig sein könnten im Vergleich zu Patienten mit primär hohem JAK2 p.V617F Nachweis. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass 6 von 7 Patienten mit JAK2 p.V617F $\leq 1\%$ einen Monat nach SCT im weiteren Verlauf Episoden mit molekularer Negativität aufwiesen.

Wir stellten deshalb die Hypothese auf, dass JAK2 p.V617F $\leq 1\%$ am Tag 28 nach SCT ein statistisch signifikanter Prädiktor für eine geringere Rezidivinzidenz im Verlauf nach SCT sein könnte.

Um diese Hypothese zu beweisen, untersuchten wir eine zweite Kohorte von 16 Patienten, die im gleichen Zeitraum zwischen 2000 und 2008 an der Universität Leipzig in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie stammzelltransplantiert wurden. Im Gegensatz zur ersten Kohorte mit seriellen Probeentnahmen waren hier Proben vom Tag 28 nach SCT verfügbar, so dass eine Gesamtkohorte von jetzt 30 Patienten für die Analyse zur Verfügung stand. Die Patientencharakteristika dieser Patienten sind in Tabelle 1 des Publikationsmanuskriptes ersichtlich.

Von 30 Patienten der Gesamtkohorte entwickelten 9 Patienten ein Rezidiv in einem Beobachtungszeitraum von 32 Monaten (Median) nach SCT. Nur JAK2 p.V617F positive Erkrankungen wurden als Rezidiv gewertet (und nicht sekundäre AML ohne JAK2

Mutationsnachweis). Sieben von 9 Patienten (78%) zeigten $\leq 1\%$ JAK2 p.V617F am Tag 28 nach SCT. Nur zwei Patienten rezidierten bei $\leq 1\%$ JAK2 p.V617F - ein Patient (UPN 6) mit der bereits erwähnten systemischen Mastozytose sowie ein weiterer Patient, der erst nach einem langen krankheitsfreien Intervall von 38 Monaten nach SCT ein Rezidiv erlitt.

Statistisch zeigte sich bei einem Nachweis von JAK2 p.V617F $\leq 1\%$ am Tag 28 nach allogener SCT ein signifikant höheres Gesamtüberleben ($p < 0,01$) und geringeres Rezidivrisiko einer JAK2 positiven MPN ($p = 0,04$) im Vergleich zu den Patienten mit Werten von JAK2 p.V617F $> 1\%$.

Mit unseren Daten konnten Grundlagen für die Bewertung von molekularen Verlaufskontrollen von Patienten mit JAK2 p.V617F positiven MPN geschaffen werden. Insbesondere die große Auswirkung effektiver Krankheitsnachsorge in den ersten Wochen nach SCT und die Erkennung eines Frührezidivs haben einen hohen Stellenwert. Mit unserem Monitoring ist der exakte Nachweis neoplastischer Zellklone auf DNA-Ebene einschließlich noch ruhender neoplastischer Zellklone möglich. Dies soll zukünftig ein frühzeitiges therapeutisches Eingreifen ermöglichen.

Dennoch werden dringend weitere Studien benötigt, um verbindliche Leitlinien zur molekularen Verlaufskontrolle dieser Patienten zu erstellen. Wir empfehlen eine Quantifizierung der JAK2 p.V617F Allele bereits vor zytoreduktiver Therapie zu beginnen und mindestens monatlich nach allogener SCT fortzusetzen. Dabei konnten wir einen Grenzwert $> 1\%$ JAK2 mutierter Allele im ersten Monat nach SCT als einen aussagekräftigen Hinweis für ein bevorstehendes Rezidiv definieren. Eine frühzeitige Reduktion der Immunsuppression oder Verabreichung von Spenderlymphozyteninfusion sollte überdacht werden.

Im Gegensatz zu anderen Autoren [37] konnten wir den DIPSS Risikoscore nicht als prädiktiven Parameter für das Überleben der Patienten unserer Kohorte bestätigen. Dies lässt sich damit erklären, dass dieses Score System ausschließlich für Patienten mit primärer Myelofibrose entwickelt wurde und nur 53% unserer Kohorte diese Erkrankung aufwiesen.

Durch die in meiner Dissertation erfolgte Etablierung und Optimierung der ARMS-QPCR wurde es möglich, die Quantifizierung der JAK2 p.V617F Mutation bereits in die Diagnostik und Routine in der Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie der Universität Leipzig einzuführen. Die in dieser Arbeit gezeigten prognostischen Bewertungen der Ergebnisse werden bei der Patientenbetreuung berücksichtigt und ermöglichen eine personalisierte Steuerung der Immunsuppression nach allogener SCT entsprechend der aktuellen Krankheitsaktivität.

4 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Meilensteine in der Verlaufskontrolle von Patienten mit JAK2
p.V617F positiver myeloproliferativer Neoplasie
nach Stammzelltransplantation

eingereicht von Anja Edelman

angefertigt an der Universität Leipzig, Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie

betreut von PD Dr. med. Thoralf Lange, Prof. Dr. med. Dr. hc. Dietger Niederwieser

September 2013

Unter dem Begriff der myeloproliferativen Neoplasien werden nach neuer WHO-Klassifikation von 2008 verschiedene Neoplasien der Myelopoese zusammengefasst. Charakteristisch ist die Vermehrung einer oder mehrerer Zellen der myeloischen Reihe im Knochenmark ausgehend von einer transformierten hämatopoetischen Stammzelle. Entscheidend ist, dass die abstammenden Blutzellen eine hohe Proliferationsaktivität aufweisen, aber zunächst noch normal ausreifen. Wie bei den meisten anderen Neoplasien ist die Ätiologie der MPN weitgehend unbekannt. Chemische Karzinogene wie Benzol oder ionisierende Strahlen sind als auslösende Ursache denkbar, in der Mehrzahl der Erkrankungen lassen sich jedoch keine schädigenden Faktoren ermitteln.

Im Verlauf können Komplikationen der MPN zum Tode führen oder die Transformation in eine sekundäre AML erfolgen. Der einzig potentiell kurative Therapieansatz ist die allogene SCT, die dennoch mit signifikanter Mortalität und Morbidität einhergeht.

Neue diagnostische Erkenntnisse ergaben sich mit der Entdeckung der für BCR-ABL negative MPN typischen JAK2 p.V617F Punktmutation, deren Nachweis heute zum diagnostischen Standardrepertoire gehört.

Wir untersuchten ein Gesamtkollektiv von 30 Patienten mit JAK2 p.V617F positiver MPN, die im Zeitraum zwischen 2000 und 2008 an der Universität Leipzig (Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie) eine allogene SCT erhielten. 146 Proben von 14

Patienten einer ersten Kohorte wurden vor und zu definierten Zeitpunkten nach SCT retrospektiv analysiert. Dafür kamen zwei Methoden, die ARMS-QPCR und die WTB-AS QPCR als allel-spezifische Amplifikationsverfahren zum quantitativen Nachweis der JAK2 p.V617F Punktmutation zur Anwendung.

Untersucht wurden 70 Proben aus antikoaguliertem Vollblut und 76 Beckenkammbiopsien.

Ein direkter Vergleich beider PCR-Methoden konnte anhand von 142 Proben vollzogen werden, die sowohl mit dem Verfahren der ARMS-QPCR als auch WTB-AS QPCR analysiert wurden. Dabei zeigte sich eine geringfügig höhere Sensitivität der WTB-AS QPCR (bis 0,01% mutiertes Allel im Vergleich zu 0,1% bei ARMS-QPCR). Allerdings ist der quantitative Messbereich der WTB-AS QPCR bei 1% ausgeschöpft, danach sind nur noch qualitative Aussagen möglich. Im Gegensatz dazu sind mit der ARMS-QPCR quantitative Ergebnisse bis 0,1% möglich. Beide Methoden sind jedoch zur Bestimmung von JAK2 p.V617F Mutation positiver Resterkrankung nach allogener SCT gleichwertig geeignet.

Im Vergleich der JAK2 p.V617F Allellast in 70 simultan entnommenen peripheren Blutproben und Beckenkammbiopsien wurden identische Ergebnisse erzielt. Beide hämatologischen Kompartimente sind also zur Quantifizierung der Mutation JAK2 p.V617F nach allogener SCT gleichwertig geeignet. Damit können bei einem Teil der Patienten Bestimmungen aus Beckenkammbiopsien durch Analysen aus peripherem Blut ersetzt werden.

An 30 Patienten nach allogener SCT konnte bei JAK2 p.V617F > 1% bereits am Tag 28 nach allogener SCT eine Assoziation mit einem hohem Rezidivrisiko ($p=0,04$) sowie einem schlechteren Gesamtüberleben ($p<0,01$) nachgewiesen werden. Deshalb sollten bei diesen Patienten bereits am Tag 28 frühzeitig Interventionen wie Reduktion der Immunsuppression vorgenommen werden.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Dameshek W. 1951. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 6: 372-375
- [2] Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. 1976. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N Engl J Med* 295: 913-916
- [3] Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. 1981. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood* 58: 916-919
- [4] Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. 1967. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58: 1468-1471
- [5] Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. 1991. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6848-6852
- [6] Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. 1978. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 51: 189-194
- [7] Tefferi A, Vardiman JW. 2008. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22: 14-22
- [8] Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. 2009. The 2008 World Health Organisation classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* 115(17): 3842-3847
- [9] Nowell PC, Hungerford DA. 1960. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.* 25: 85-109
- [10] Spivak JL, Barosi G, Tognoni G, Barbui T, Finazzi G, et al. 2003. Chronic myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 200-224
- [11] Gruppo Italiano Studio Policitemia. 1995. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 123: 656-664
- [12] Campbell PJ, Green AR. 2006. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 355: 2452-2466
- [13] Cervantes F, Tassies D, Salgado C, Rovira M, Pereira A, Rozman C. 1991. Acute transformation in nonleukemic chronic myeloproliferative disorders: actuarial probability and main characteristics in a series of 218 patients. *Acta Haematol* 85: 124-127
- [14] Rozman C, Giral M, Feliu E, Rubio D, Cortes MT. 1991. Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer* 67: 2658-2663
- [15] Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, et al. 2005. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365: 1054-1061
- [16] James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, et al. 2005. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144-1148
- [17] Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, et al. 2005. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779-1790
- [18] Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, et al. 2005. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7: 387-397

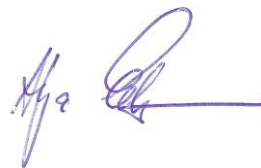
- [19] Bennett M, Stroncek DF. 2006. Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases. *J Transl Med* 4: 41
- [20] Speletas M, et al. 2006. Correlations of JAK2-V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk Res* 31(8): 1053-1062
- [21] Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz Sb, et al. 2005. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythaemia vera. *J Biol Chem* 280: 22788-22792
- [22] Lu X, Levine R, Tong W, et al. 2005. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18962-18967
- [23] Lange T, Kiefer T, Junghanss C, Wickenhauser C, Ernst T, Heidel F. 2012. Myeloproliferative Neoplasien, aktuelle Standards und Entwicklungen. *best practice onkologie* 5(7): 34-44
- [24] Tefferi A. 2011. How I treat myelofibrosis. *Blood* 117: 3494-3504
- [25] Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. 2009. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 113: 2895-2901
- [26] Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. 2010. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood* 115: 1703-1708
- [27] Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. 2011. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol* 29: 392-397
- [28] Passamonti F, Thiele J, Girodon F, et al. 2012. A prognostic model to predict survival in 867 WHO-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the IWG-MRT. *Blood* 120: 1197-1201
- [29] Alchalby H, Yunus DR, Zabelina T, et al. 2012. Risk models predicting survival after reduced-intensity transplantation for myelofibrosis. *BR J Haematol* 157: 75-85
- [30] Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, et al. 2004. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med* 350: 114-124
- [31] Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. 2012. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med* 366: 799-807
- [32] Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, et al. 2012. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* 366: 787-798
- [33] Kantarjian HM, Talpaz M, Gutterman JU. 1988. Chronic myelogenous leukemia - past present and future. *Hematol Pathol* 2: 91-120
- [34] Kiladjian JJ, Mesa RA, Hoffman R. 2011. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* 117: 4706-4715
- [35] Siebolts U, Lange T, Niederwieser D, Wickenhauser C. 2010. Allele-specific wild-type blocker quantitative PCR for highly sensitive detection of rare JAK2 p.V617F point mutation in primary myelofibrosis as an appropriate tool for the monitoring of molecular remission following therapy. *J Clin Pathol* 63: 370-372
- [36] Kröger N, Badbaran A, Holler E, Hahn J, Kobbe G, et al. 2007. Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood* 109(3): 1316-1321
- [37] Scott BL, Gooley TA, Sorrow ML, et al. 2012. The Dynamic International Prognostic Scoring System for myelofibrosis predicts outcomes after hematopoietic cell transplantation. *Blood* 119(11): 2657-2664

6 Anhang

6.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen oder von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, 09.09.2013



.....

Unterschrift

6.2 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Thoralf Lange, insbesondere für die Anregung zur Bearbeitung dieses Themas, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, viele wertvolle Ratschläge und konstruktive fachliche Diskussionen im Rahmen einer sehr freundschaftlichen Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich weiterhin bei Frau Professor Dr. med. Claudia Wickenhauser bedanken, die eine interdisziplinäre Zusammenarbeit mit dem Fachgebiet der Pathologie ermöglichte. Auch ihr bin ich für eine hervorragende wissenschaftliche Unterstützung und hilfreiche Beratung sehr dankbar.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Dr. hc. Dietger Niederwieser für die Möglichkeit, in seiner Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie an der Universität Leipzig zu promovieren.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Oliver Pelz-Ackermann sowie allen weiteren Personen, die bei der Durchführung dieser experimentellen Arbeit mitgewirkt und den reibungslosen Ablauf des Projektes ermöglicht haben. Nur so war es mir möglich, trotz gleichzeitigem Semesterbetrieb die Messungen durchführen zu können.

Allen Patienten danke ich für die Einwilligung zur Verwendung von Blut- bzw. Knochenmarksproben und ihr Vertrauen.

6.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Anja Edelmann
Geburtsdatum 18.03.1986
Geburtsort Berlin
Familienstand ledig

Schulbildung

1992 - 1996 Grundschole Wachau
1996 - 2004 Rudolf-Hildebrand-Gymnasium Markkleeberg,
Abschluss: Abitur (Note 1,2)

Sprachzertifikate

2002 DELF (Diplôme d'études en langue française)
2003 FCE (First Certificate in English)
2006 UNicert[®] III (English for medical purposes)
2011 IELTS (International English Language Testing System)

Hochschulausbildung

2004 - 2010 Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig
13.06.2006 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Physikum)
21.10.2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Auslandsaufenthalte

09/2005 Krankenpflegepraktikum (Psychiatrie)
Cardinal Clinic, Windsor, England

02/2008 Famulatur (Notfallmedizin)
Wimmera Base Hospital, Horsham, Australien

08/2008 Famulatur (Gynäkologie)
Kilimanjaro Christian Medical Centre (KCMC),
Tansania, Afrika

08/2009 - 10/2009 Praktisches Jahr (Chirurgie)
John Hunter Hospital, Newcastle, Australien

Berufliche Tätigkeiten

03-08/2011 Assistenzärztin
Abt. für Innere Medizin und Kardiologie,
Herzzentrum Leipzig

seit 09/2011 Assistenzärztin
Abt. für Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Universität Leipzig

10/2012 Kurs zur Erlangung der Zusatzbezeichnung
Notfallmedizin

6.4 Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson-Gen
AML	Akute myeloische Leukämie
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ARMS-QPCR	Allel-spezifische quantitative Real-Time PCR
ASS	Acetylsalicylsäure
BCR	Breakpoint-cluster-region
CML	Chronische myeloische Leukämie
Cys	Cystein
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System
ET	Essentielle Thrombozythämie
EPO	Erythropoetin
FERM	Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor
Gly	Glycin
IPSS	International Prognostic Scoring System
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
MPD	Myeloproliferative Erkrankung
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
PCR	Polymerasekettenreaktion
Phe	Phenylalanin
PMF	Primäre Myelofibrose
PV	Polycythaemia vera
SCT	Stammzelltransplantation
STAT	Signaltransducers and Activators of Transcription
TPO	Thrombopoetin
Val	Valin
WHO	World Health Organisation
WTB-AS QPCR	Allel-spezifische quantitative Real-Time PCR mit Wildtyp-Blockade